



超低振動数領域まで測定可能な共焦点顕微ラマン分光装置の開発と分裂酵母生細胞への応用

| | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 著者 | 島端 要典 |
| 発行年 | 2017 |
| URL | http://hdl.handle.net/10236/00027131 |

超低振動数領域まで測定可能な共焦点顕微ラマン分光装置の開発と

分裂酵母生細胞への応用

関西学院大学大学院理工学研究科

化学専攻 重藤研究室 島端要典

【序】生細胞の分子レベルでの機能解明は、生物学のみならず化学や物理学の観点からも重要視されている。生細胞は水分子やタンパク質・脂質などの生体分子が混在した複雑な環境であり、*in vitro*の系とは大きく異なる相互作用が生じている系と考えられる。単一生細胞における生体分子間相互作用を明らかにするためには、従来のラマン分光でよく議論される指紋領域 ($800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) に加え、分子間相互作用の直接的なプローブとなる低振動数領域 ($<200\text{ cm}^{-1}$) の観測が重要である。本研究では、高い空間分解能で、超低振動数領域のラマンスペクトルを測定することが可能な共焦点顕微ラマン分光装置を開発し、単一分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 細胞内の分子間相互作用の研究 (実験1) およびアンチストークス対ストークスラマン強度比に基づいた生体分子の温度計測 (実験2) への応用を試みた。

【装置】図1は、本研究で開発した He-Ne レーザー (波長 632.8 nm) を励起光源とした共焦点顕微ラマン分光装置である。3枚の体積ブラッグ回折格子ノッチフィルター (BragGrate notch filter (BNF), OptiGrate) を用いることにより、極めて狭いバンド幅でレイリー散乱光を効率よく除去することができる。レイリー除去能評価によく用いられる L-シスチンを用いて性能評価を行ったところ、 $\pm 9.8\text{ cm}^{-1}$ のバンドを明瞭に観測することに成功した。装置の空間分解能は面内方向で $0.43\text{ }\mu\text{m}$ 、深さ方向で $4.4\text{ }\mu\text{m}$ であった。また、スペクトル分解能は約 7 cm^{-1} であった。

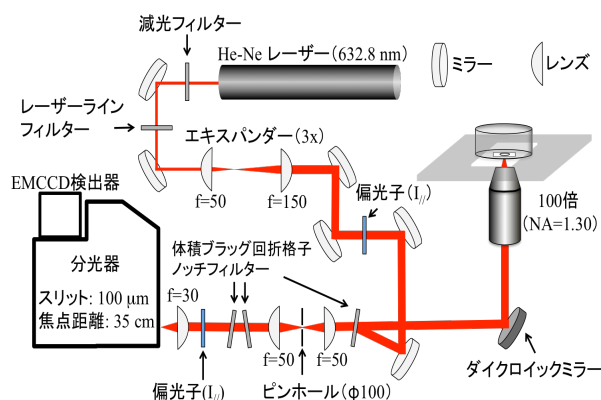


図1 構築した共焦点顕微ラマン分光装置概略図

【実験1】細胞中の細胞質のような高密度分子環境の超低振動数ラマンスペクトルがどのようなパターンを示すのかを調べるために、細胞内環境を模倣するポリエチレングリコールジメチルエーテル (PEG-DME) 水溶液を用いた実験を行った。ここで、実測のスペクトル $I_{obs}(\tilde{\nu})$ を式(1)により還元スペクトル $I_{red}(\tilde{\nu})$ へと変換することで、より詳細な議論を可能とした。

$$I_{red}(\tilde{\nu}) = \left[1 - \exp\left(-\frac{hc\tilde{\nu}}{k_B T}\right) \right] (\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu})^{-3} I_{obs}(\tilde{\nu}) \quad (1)$$

約 60 cm^{-1} に見られるブロードなラマンバンドのピークは分子間相互作用の強度を反映しており、水溶液が高濃度すなわち高粘度の場合ほど高振動数側に位置していた。したがって、このバンドのピーク位置から試料の粘性 (混み具合) に関する知見が得られるものと期待される。この結果を踏まえ、単一分裂酵母生細胞における *in vivo* 低振動数ラマン分光測定を行った。図2に約 60 cm^{-1} にバンドのピーク位置に基づいて構築したラマンイメージを示す。細胞の中心部分 (核が存在すると考えられる)

ではピークが高振動数側に位置しており、その周辺の細胞質と比べて、より粘度が高い環境であることを示唆している。このことは、核の内部にDNA/RNAやタンパク質が高密度に存在しているという生物学的な知見と矛盾しない。本研究により、分子間振動スペクトルを用いた生細胞内の相対的な粘度の可視化の可能性が示された。これは分子内振動スペクトルからは得られない新たな知見である。

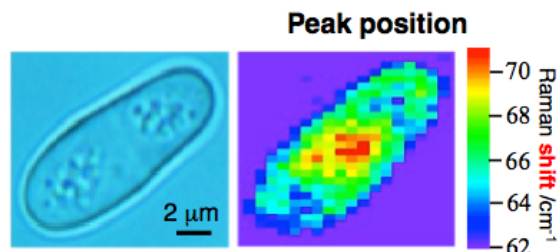


図2 (a)分裂酵母生細胞の光学顕微鏡像(b)約 60 cm⁻¹のピーク位置より作成したラマンイメージ

【実験2】非共鳴ラマン散乱では、アンチストークス対ストークス強度比 $I_{\text{anti-Stokes}}/I_{\text{Stokes}}$ と分子の絶対温度 T の関係は式(2)で与えられる。

$$\frac{I_{\text{anti-Stokes}}}{I_{\text{Stokes}}} \frac{(\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu})^3}{(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu})^3} = \exp\left(-\frac{ch\tilde{\nu}}{k_B T}\right) \quad (2)$$

室温程度(298 K)で実験を行う場合、800 cm⁻¹より高振動数領域ではアンチストークスラマン散乱強度が限りなく小さくなり、検出が極めて困難になる。しかし、超低振動数領域(<200 cm⁻¹)では解析に十分な強度でバンドが観測されることから、式(2)から分子の絶対温度 T を実験的に決定する事ができる。 $I_{\text{anti-Stokes}}/I_{\text{Stokes}}$ から温度を正確に求めるためには、分光装置の感度校正が鍵となる。N₂の純回転スペクトルを用いた感度校正により水の温度を1 K以下の誤差で決定することに成功している例¹⁾もあるが、測定に長時間を要するという問題があった。そこで、0.2 nm間隔で強度の相対値が保証されている標準光源(IntelliCal, Princeton Instruments)による感度較正を行うことで、短時間かつ精密さを追求した水の温度計測を行った。実測の水のラマンスペクトルより計算される式(2)左辺の量を、絶対温度 T をパラメーターとする指数関数でフィットしたところ(図3)、水の温度は28.7(±0.6) °Cとなった。熱電対で測定したレーザー集光点における液温は25.3(±0.5) °Cであり、まだ3 °C程度の誤差があるが、分光装置の調整や最適の感度較正法の探索を行うことで確度を向上させる事ができると考えている。

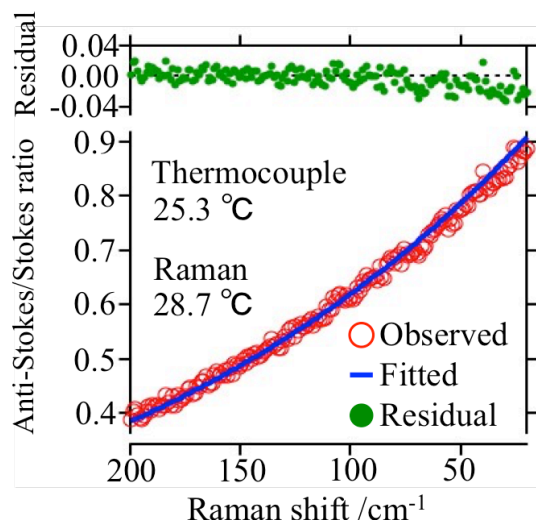


図3 アンチストークス対ストークス強度比

[1] H. Okajima and H. Hamaguchi, *J. Raman Spectrosc.* **46**, 1140 (2015).